

Truncated versions of exendin peptide(s) for treating diabetes**Publication number:** DE19637230**Publication date:** 1998-03-19**Inventor:** HOFFMANN EIKE DIPL CHEM DR (DE); GOEKE
RUEDIGER DR (DE); GOEKE BURKHARD PROF DR
(DE)**Applicant:** BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE)**Classification:****- international:** C07K14/575; A61K38/00; C07K14/435; A61K38/00;
(IPC1-7): C07K14/195; A61K38/16**- European:** C07K14/575L**Application number:** DE19961037230 19960913**Priority number(s):** DE19961037230 19960913**Report a data error here****Abstract of DE19637230**

Peptides (I) and (II), their salts and esters, and derivatives with residues 1, 2, 28, 29 and/or 30 deleted, are new: R1R2N-HSDGFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGX-COR3 (I) R1R2N-HGEGFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGX-COR3 (II) R1 = hydrogen, acetyl, trifluoroacetyl, adamantyl, fluorenyloxymethyl, benzyloxymethyl, butoxycarbonyl, Alloc (not defined), 1-6C alkyl, 2-8C alkenyl or 7-9C aralkyl R2 = R1 except that 1-6C alkyl is replaced by 4-6C alkyl R3 = OR4 or NR4R5 R4 = H or 1-6C alkyl R5 = H or 1-6C alkyl. Also new are derivatives of (I) and (II), with up to 11 specific modifications in the peptide chain.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



DEUTSCHES
PATENTAMT

②① Aktenzeichen: 196 37 230.5
②② Anmeldetag: 13. 9. 96
④③ Offenlegungstag: 19. 3. 98

DE 196 37 230 A 1

⑦① Anmelder:

Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim, DE

⑦② Erfinder:

Hoffmann, Eike, Dipl.-Chem. Dr., 68519 Viernheim,
DE; Göke, Rüdiger, Dr., 35043 Marburg, DE; Göke,
Burkhard, Prof. Dr., 35043 Marburg, DE

⑤④ Exendin-Analoga, Verfahren zu deren Herstellung und diese enthaltende Arzneimittel

⑤⑦ Diese Erfindung betrifft neue Exendin-Analoga, welche bei
der Therapie des Diabetes mellitus eingesetzt werden
können, Verfahren zu deren Herstellung und diese enthalten-
de Arzneimittel. Die Exendin Analoga leiten sich von

SEQ ID NO: 1

```
1      5      10      15
H S D G T F T S D L S K Q M E E E A V
20      25      30
R L F I E W L K N G X
```

oder

SEQ ID NO: 2

```
1      5      10      15
H G E G T F T S D L S K Q M E E E A V
20      25      30
R L F I E W L K N G X
```

ab.

DE 196 37 230 A 1

Beschreibung

Diese Erfindung betrifft neue Exendin-Analoga, welche bei der Therapie des Diabetes mellitus eingesetzt werden können, Verfahren zu deren Herstellung und diese enthaltende Arzneimittel.

Hintergrund der Erfindung

Eine funktionelle Verbindung zwischen Dünndarm und exokrinem Pankreas wurde in den sechziger Jahren bewiesen, nachdem die exakte Bestimmung von Insulin im Plasma möglich wurde. Die Insulinantwort nach oraler Glukosegabe ist wesentlich kräftiger als die nach intravenöser Glukoseapplikation, auch wenn identische Glukoseplasmaspiegel erreicht werden. Diesen "Inkretin-Effekt" erklärt man im funktionellen Verbund der entero-insulären Achse. Verantwortlich für diesen Effekt sind Darmhormone, die nach Mahlzeiten vom Dünndarm freigesetzt, erhöht meßbar im Plasma zirkulieren und die Glukose-induzierte Insulinfreisetzung verstärken. Neben dem klassischen Inkretinhormon "Gastric inhibitory polypeptide I" (GIP), ist heute "Glucagon-like peptide-1" (GLP-1) in den Vordergrund des Interesses gerückt. In relativ kurzer Zeit ist GLP-1 vom physiologisch interessantesten Inkretinhormon-Kandidaten zur potentiellen Alternative zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ II gereift. Die vorliegende Erfindung beschreibt neue Substanzen, die dem natürlich vorkommenden GLP-1 Molekül in der Wirkung nachempfunden sind. Die neuen Substanzen zeichnen sich durch erhöhte Stabilität bei erhaltener Wirksamkeit aus.

Antidiabetogene Wirkung

Infusion und subkutane Injektion von GLP-1 bewirken bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II eine deutliche Steigerung der Insulinsekretion sowie eine Hemmung der Glukagonfreisetzung (Gutniak, M. (1992); Kreymann, B. (1987); Nathan, D.M. (1992); Nauck, M.A. (1993a & b)). Beides ist aus therapeutischer Sicht von Interesse und an der blutzuckersenkenden Wirkung von GLP-1 beteiligt: Insulin fördert an seinen Zielgeweben die Glukoseaufnahme sowie eine Hemmung der Glukoneogenese. Desweiteren ist bei GLP-1-Analogen eine Verstärkung der Glukoseaufnahme in der Peripherie zu erwarten. Die Hemmung der Glukagonsekretion muß als indirekte GLP-1-Wirkung angesehen werden, da Glukagon-produzierende A-Zellen keine GLP-1 Rezeptoren exprimieren (Komatsu, R. (1989)). Vielmehr scheint dafür die erhöhte Insulin- und Somatostatinfreisetzung ausschlaggebend zu sein. Beide Hormone sind als Hemmstoffe der Glukagonfreisetzung bekannt.

Sicherlich tragen zwei molekulare Mechanismen zur GLP-1-induzierten Insulinfreisetzung bei Diabetes mellitus Typ II bei. Neben der direkten Verstärkung der Glukose-induzierten Insulinfreisetzung sensibilisiert GLP-1 eine Subgruppe von B-Zellen gegenüber dem Schlüsselreiz "Glukose" (Fehmann, H.C. (1991)) und möglicherweise auch gegenüber weiteren Stimuli, so daß insgesamt mehr B-Zellen Insulin sezernieren. Diese "Priming"-Wirkung erklärt am ehesten die Tatsache, daß GLP-1 trotz seiner relativ kurzen Plasma-Halbwertszeit zu einer langanhaltenden Insulinfreisetzung führt.

Diese Wirkung ist abhängig von erhöhten Glukose-Spiegeln ($> 108 \text{ mg/dl}$) (Göke, R. (1993a)). Sie unterscheidet GLP-1 grundsätzlich von den Sulfonylharnstoffen, die die Insulinsekretion unabhängig vom Glukose-Plasmaspiegel beeinflussen. Sinkt der Glukosewert unter 108 mg/dl , so versiegt die Insulinsekretion selbst bei intravenöser Infusion von GLP-1. Daher sind beim therapeutischen Einsatz von GLP-1 kaum Hypoglykämien zu erwarten. Tatsächlich wurden sie in den bisherigen klinischen Studien auch nicht beschrieben. Problematisch sind allerdings die pharmakokinetischen Eigenschaften von GLP-1. Aufgrund seiner sehr kurzen Halbwertszeit ist die Wirkdauer nur begrenzt.

Aus therapeutischer Sicht ist in jedem Fall die Synthese stabiler und wirkungsstarker GLP-1 analoger Peptide wünschenswert. Es wurden nun auf der Basis des ursprünglich aus dem Gift von Echsen isolierten Moleküls Exendin Peptidanaloga synthetisiert, mit dem Ziel verbesserte abbaustabilisierte Therapeutika mit verlängerter Wirkdauer zur Behandlung des Diabetes mellitus zu entwickeln. Diese Peptide haben die gleiche pharmakologische Wirkung wie GLP-1, weisen aber überraschenderweise eine deutlich längere Halbwertszeit auf.

Die als Gegenstand der Erfindung beschriebenen neuen Peptidsequenzen zeigen Wirkung auf Insulinsynthese und -abgabe sowie Wirkung auf den Insulineffekt insbesondere die Glukoseaufnahme in den Zielgeweben Muskel- und Fettgewebe, sowie der Magenentleerung.

Gegenstand der Erfindung

Die vorliegende Erfindung basiert auf der Sequenz von Exendin-3 und Exendin-t, Peptiden, welche aus dem Sekret von *Heloderma horridum* bzw. *Heloderma suspectum* isoliert wurden (Eng, J. et al. (1990, 1992)). Die Aminosäuren-Sequenz und Wirkung der beiden Peptide am Pankreas wurde bereits von mehreren Autoren publiziert (Eng, J. et al. (1990); Raufman, J. P. (1992); Göke, R. (1993b); Thorens, B. (1993)). Gegenstand dieser Erfindung sind neue verkürzte Exendin-Fragmente, welche die Aminosäuresequenzen von Exendin-3-(1-30), oder Exendin-4-(1-30) umfassen, wobei das C-terminale Ende dieser Sequenzen um bis zu 3 Aminosäuren verkürzt, vorzugsweise um höchstens 1 Aminosäure, und das N-terminale Ende um bis zu 2, vorzugsweise höchstens 1 Aminosäure, verkürzt sein kann. Besonders bevorzugt sind also Peptidfragmente mit den folgenden Sequenzen; insbesondere sind die Peptidfragmente, die auf Exendin-3-(1-30) (Seq. ID No. 1) beruhen:

SEQ ID NO: 1 basiert auf Exendin-3

1	5	10	15	5															
H	S	D	G	T	F	T	S	D	L	S	K	Q	M	E	E	E	A	V	
20	25	30																	
R	L	F	I	E	W	L	K	N	G	X ₁									10

SEQ ID NO: 2 basiert auf Exendin-4

1	5	10	15																
H	G	E	G	T	F	T	S	D	L	S	K	Q	M	E	E	E	A	V	
20	25	30	35	38	20														
R	L	F	I	E	W	L	K	N	G	X ₁									

wobei die Aminosäuren an Position 1, 2, 28, 29 oder 30 je nach gewünschter Kettenlänge Teil der Sequenz sein können. Die Peptide sind vom N-Terminus zum C-Terminus durchnummeriert. X₁ bedeutet eine proteogene oder nichtproteogene Aminosäure außer Glycin. 25

Die Carboxylgruppe COR₃ der Aminosäure am C-terminalen Ende kann in freier Form (R₃ = OH) oder in Form eines physiologisch verträglichen Alkali- oder Erdalkalisalzes, wie z. B. des Natrium-, Kalium- oder Calciumsalzes vorliegen. Die Carboxylgruppe kann auch mit primären, sekundären oder tertiären Alkoholen verestert sein, wie z. B. Methanol, verzweigten oder unverzweigten C₁–C₆-Alkylalkoholen, insbesondere Ethylalkohol oder tert.-Butanol. Die Carboxylgruppe kann aber auch mit primären oder sekundären Aminen amidiert sein, wie z. B. Ammoniak, verzweigten oder unverzweigten C₁–C₆-Alkylaminen oder C₁–C₆-Di-Alkylaminen, insbesondere Methylamin oder Dimethylamin. 30

Die Aminogruppe der Aminosäure NR₁R₂ am N-terminalen Ende kann in freier Form (R₁, R₂ = H) oder in Form eines physiologisch verträglichen Salzes, wie z. B. des Chlorides oder Acetats vorliegen. Die Aminogruppe kann auch mit Säuren acetyliert sein, so daß R₁ = H und R₂ = Acetyl-, Trifluoracetyl-, Adamantyl-, oder durch die gängigen Aminoschutzgruppen der Peptidchemie, wie z. B. Fmoc, Z, Boc, Alloc geschützt vorliegen, oder N-alkyliert sein mit R₁ und/oder R₂ = C₁–C₆-Alkyl oder C₂–C₈-Alkenyl oder C₇–C₉-Aralkyl. 35

Unter Alkylresten werden geradkettige, verzweigte oder gegebenenfalls ringförmige Alkylreste verstanden, vorzugsweise Methyl, Ethyl, Isopropyl und Cyclohexyl. 40

Alle Exendin-Fragmente können als voll oder partiell geschützte Derivate vorliegen.

Gegenstand dieser Erfindung sind außerdem Exendin-Fragmente mit den oben genannten Eigenschaften und Sequenzlängen, bei denen zusätzlich mindestens eine aber maximal elf der unter (a) bis (p) aufgeführten Modifikationen durchgeführt wurden. Bevorzugt sind solche Exendin-Fragmente, die maximal 9, besonders bevorzugt sind solche, die maximal 5 der unter (a) bis (p) aufgeführten Modifikationen aufweisen. 45

(a) Die α-Aminosäure in Position 1 ist D–His, Ala, D–Ala, Gly, Lys oder D–Lys, wobei Ala, Gly oder Lys besonders bevorzugt werden; oder

(b) Die α-Aminosäure in Position 2 ist Ser, D–Ser, Thr, D–Thr, Gly, Ala, D–Ala, Ile, D–Ile, Val, D–Val, Leu oder D–Leu, bevorzugt Ser, Thr, Gly, Ala, Val, Ile oder Leu; oder 50

(c) Die α-Aminosäure in Position 3 ist Glu, D–Glu, Asp, D–Asp, Ala oder D–Ala, bevorzugt Glu, Asp oder Ala; oder

(d) Die Aminosäure in Position 4 ist Ala, D–Ala oder β-Ala, bevorzugt Ala; oder

(e) Die α-Aminosäure in Position 5 ist Ser, Tyr oder Ala; oder 55

(f) Die α-Aminosäure in Position 6 ist Ala, Ile, Val, Leu, Cha oder Tyr, bevorzugt Ala, Ile, Val, Leu oder Tyr; oder

(g) Die α-Aminosäure in Position 7 ist Ala, D–Ala, Tyr, D–Tyr, Ser, D–Ser oder D–Thr, bevorzugt Ala, Tyr oder Ser; oder

(h) Die α-Aminosäure in Position 8 ist Ala, Tyr oder Thr; oder 60

(i) Die α-Aminosäure in Position 9 ist Ala, D–Ala, Glu, D–Glu oder D–Asp, bevorzugt Ala oder Glu; oder

(j) Die Aminosäuren in Position 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 28, 29 sind unabhängig voneinander eine proteinogene oder nicht-proteinogene D- oder L-Aminosäure, bevorzugt eine proteinogene L-Aminosäure; oder

(k) Die α-Aminosäure in Position 13 ist eine neutrale L-Aminosäure, bevorzugt eine neutrale proteinogene L-Aminosäure; oder 65

(l) Die α-Aminosäure in Position 14 wird zur Stabilisierung ersetzt durch eine neutrale L- oder D-Aminosäure, außer L-Leucin, bevorzugt durch Nle, D-Nle, Ala, D–Ala, Ile, D–Ile, Val oder D–Val, besonders

bevorzugt sind Ile, Val oder Ala; oder

(m) Die α -Aminosäure in Position 22 ist D—Phe, Tyr, D—Tyr, Leu, D—Leu, Val, D—Val, L—Cha, D—Cha, β -1-Nal, β -2-Nal oder β -1-D-Nal, bevorzugt sind Tyr, Leu oder Val; oder

(n) Die α -Aminosäure in Position 23 ist Leu, D—Leu, D—Ile, Val, D—Val, L—Cha, D—Cha, Tyr, D—Tyr, Phe oder D—Phe, bevorzugt sind Leu, Val, Tyr oder Phe; oder

(o) Die α -Aminosäure in Position 25, 26 oder 27 ist eine neutrale L- oder D-Aminosäure, bevorzugt eine neutrale, proteinogene L-Aminosäure; oder

(p) Die α -Aminosäure in Position 30 ist eine proteinogene oder nicht-proteinogene D- oder L-Aminosäure außer Glycin, bevorzugt Arg, D—Arg, Tyr oder D—Tyr, besonders bevorzugt sind Arg oder Tyr.

Unter den neuen Exendin-Fragmenten sind solche besonders bevorzugt, welche neben den schon genannten Eigenschaften und Sequenzlängen, an Position 10 die Aminosäure Leucin und/oder an Position 19 die Aminosäure Valin, an Position 14 anstelle von Methionin die Aminosäure Isoleucin oder Alanin und an Position 30 Arginin enthalten. Besonders bevorzugt sind auch diejenigen Modifikationen von Exendin-Fragmenten, bei denen sich, zusätzlich zu den erwähnten besonders bevorzugten Aminosäuren an den Positionen 10, 14, 19 und 30, an der Position 2 eine der 20 bekannten proteinogenen L-Aminosäuren befindet.

Gegenstand der Erfindung sind neben neuen verkürzten und stabilisierten Exendin-3 und Exendin-4 Analoga auch Verfahren zur Herstellung dieser Analoga, bei denen man die Analoga in Festphasensynthese aus geschützten, in den Analoga enthaltenen Aminosäuren, herstellt, die in der Reihenfolge aneinander gekoppelt werden, welche den Aminosäuresequenzen in den Analoga entsprechen und welche gegebenenfalls durch entsprechende nicht in den natürlichen Exendin-Peptiden vorkommende Aminosäuren ergänzt wurden.

Das Glycin in Position 30, der Exendin-3 oder Exendin-4-Sequenz wurde gegen eine andere proteogene oder nicht-proteogene Aminosäure ausgetauscht, um bei der Synthese nach der Abspaltung der aminoterminalen Schutzgruppe, keine Diketopiperazinbildung vorliegen zu haben.

Die Exendin-(1—30)-Analoga und Fragmente sind gegenüber den Exendinen-1(1—39) vorteilhaft, da durch die kürzeren Sequenzen diese Analoga einfacher und in höheren Ausbeuten synthetisiert werden können.

Die verwendeten Abkürzungen und Definitionen der Aminosäuren wurden in Pure Appl. Chem. 31, 639—45 (1972) und ibid. 40, 277—90 (1974) empfohlen und stimmen mit den PCT-Regeln (WIPO Standard St. 23: Recommendation for the Presentation of Nucleotide and Amino Acid Sequences in Patent Applications and in Published Patent Documents) überein. Die Ein- bzw. Drei-Buchstabencodes sind wie folgt:

Aminosäure	Drei-Buchstaben-Code	Ein-Buchstaben-Code	
Alanin	Ala	A	5
Arginin	Arg	R	
Asparagin	Asn	N	10
Asparaginsäure	Asp	D	
Cystein	Cys	C	
Glutamin	Gln	Q	15
Glutaminsäure	Glu	E	
Glycin	Gly	G	
Histidin	His	H	20
Isoleucin	Ile	I	
Leucin	Leu	L	
Lysin	Lys	K	25
Methionin	Met	M	
Phenylalanin	Phe	F	30
Prolin	Pro	P	
Serin	Ser	S	
Threonin	Thr	T	35
Tryptophan	Trp	W	
Tyrosin	Tyr	Y	
Valin	Val	V	40
andere Aminosäuren	Xaa	X	

Die Abkürzungen stehen für L-Aminosäuren, falls keine weiteren Spezifikationen wie D- oder D,L- angegeben sind. D-Aminosäuren werden im Ein-Buchstabencode mit kleinen Buchstaben geschrieben. Bestimmte Aminosäuren, natürliche wie nichtnatürliche sind achiral, z. B. Glycin. Bei der Darstellung aller Peptide befindet sich das N-terminale Ende links und das C-terminale Ende rechts. 45

Beispiele für nichtproteinogene Aminosäuren sind in folgender Auflistung mit ihren Abkürzungen angegeben:

β-Alanin	β-Ala	
o-Aminobenzoessäure	Oab	
m-Aminobenzoessäure	Mab	
p-Aminobenzoessäure	Pab	
m-Aminomethylbenzoessäure	Amb	55
ω-Aminohexansäure	Ahx	
ω-Aminoheptansäure	Ahp	
ω-Aminooctansäure	Aoc	
ω-Aminodecansäure	Ade	60
ω-Aminotetradecansäure	Atd	
Citrullin	Cit	
Cyclohexylalanin	Cha	
α,γ-Diaminobuttersäure	Dab	
α,β-Diaminopropionsäure	Dap	65
Methionin-Sulfoxid	Met(O)	
C ^α -Methyl-Alanin	Aib	

	N-Methyl-Glycin (Sarkosin)	Sar
	Naphtylalanin	Na
	Norleucin	Nie
	Ornithin	Orn
5	1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure	Tic

Alle Aminosäuren lassen sich nach ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften in die folgenden drei Hauptklassen unterteilen:

10 Sauer: Die Aminosäure gibt in wäßriger Lösung und bei physiologischem pH ein Proton ab und trägt infolgedessen eine negative Ladung.

Basisch: Die Aminosäure nimmt in wäßriger Lösung und bei physiologischem pH ein Proton auf und trägt infolgedessen eine positive Ladung.

Neutral: Die Aminosäure ist in wäßriger Lösung und bei physiologischem pH in einem ungeladenen Zustand.

15 Die Definition "trägt eine positive/negative Ladung" oder "ist im ungeladenen Zustand" trifft dabei dann zu, wenn im statistischen Mittel eine signifikante Anzahl von Aminosäuren einer Klasse (mindestens 25%) sich im genannten Zustand befindet.

20 Neben den 20 sogenannten proteinogenen Aminosäuren, deren Einbau in Proteine durch die Information des genetischen Codes geregelt ist, lassen sich auch nicht proteinogene über die beschriebenen Syntheseverfahren in Peptidsequenzen einbauen. Eine Aufzählung der proteinogenen Aminosäuren und deren Einteilung in die oben genannten drei Klassen ist in Tabelle 1 gegeben. Nicht-proteinogene Aminosäuren sind nicht genetisch codiert. Beispiele für nicht-proteinogene Aminosäuren und deren Einteilung in saure, basische oder neutrale Aminosäuren sind in Tabelle 1 gegeben.

25 Tabelle 1

	proteinogen	nicht proteinoge
30 sauer	Asp, Glu	
basisch	Arg, His, Lys	Dab, Dap, Orn
35 neutral	Ala, Asn, Cys, Gln, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val	β -Ala, Aib, Cit, Cha, Oab, Mab, Pab, Amb, Ahx, Ahp, Aoc, Ade, Atd, Nal, Nle, Sar, Tic

40 Die Exendin Analoga, welche Gegenstand dieser Erfindung sind, besitzen vorteilhafte therapeutische Eigenschaften. So führen sie zu einer Stimulation der Insulinfreisetzung aus dem endokrinen Pankreas, zu einer Erhöhung der Insulinbiosynthese sowie zu einer vermehrten peripheren Glukose-Utilisation. Da diese Effekte
45 nur bei gleichzeitig erhöhten Blutzuckerspiegeln zu beobachten sind, ist nach ihrer Verabreichung nicht mit dem Auftreten einer Hypoglykämie zu rechnen. Weiterhin hemmen die Exendin-Analoga die Glukagonfreisetzung aus dem endokrinen Pankreas und führen so zu einer Absenkung der Glukoneogenese. Die Exendin-Analoga führen beim nicht-insulinabhängigen Diabetes mellitus (NIDDM) zu einer deutlichen Verbesserung der Stoffwechselsituation. Insbesondere wird unabhängig von der Insulin-sekretorischen Wirkung die Glukoseaufnahme
50 in Muskel- und Fettgewebe gesteigert. Aufgrund der inhibitorischen Wirkung auf die Glukagonfreisetzung ist auch die Verabreichung der Exendin-Analoga beim insulinabhängigen Diabetes mellitus sinnvoll. Gegenüber Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) und den bekannten Exendin-3 und Exendin-4 Sequenzen besitzen die erfindungsgemäßen Exendin-Analoga eine überraschend höhere Wirksamkeit in den verschiedenen Testsystemen, so daß sie für eine therapeutische Anwendung besser geeignet sind als GLP-1, Exendin-3 oder Exendin-4. Die
55 Vorteile der neuen Exendin-Analoga sind insbesondere die folgenden: höhere Stabilität gegenüber Abbau und Metabolisierung, längere Wirkdauer, Wirksamkeit bei niedrigeren Dosen. Besondere bevorzugt sind Analoga auf Basis von Exendin-3, die besonders lange Wirkdauern oder Wirksamkeit bei besonders niedriger Dosis zeigen.

60 Die Festphasen- und Flüssigphasensynthese ist ein übliches Verfahren zur Herstellung von Peptiden. Um das Verfahren für die Herstellung eines bestimmten Produktes im Hinblick auf die Reinheit des Rohproduktes und die Ausbeute zu optimieren, ist es erforderlich, die Prozeßparameter und die verwendeten Materialien, beispielsweise das Trägermaterial, die Reagenzien, welche Gruppen zur Reaktion bringen sollen, die Materialien für das Blockieren der Gruppen, welche nicht reagieren sollen, oder die Reagenzien, welche blockierende Materialien
65 abspalten, an das herzustellende Produkt, an die herzustellenden Zwischenprodukte bzw. Ausgangsmaterialien anzupassen. Diese Anpassung ist angesichts der Interpendenz der vielen Verfahrensparameter nicht einfach.

Arzneimittel, welche die erfindungsgemäßen Peptide einzeln oder zusammen als aktiven Wirkstoff neben üblichen Hilfs- und Zusatzstoffen enthalten, werden vorzugsweise parenteral (subcutan, intramuskulär oder intravenös) verabreicht. In Frage kommen aber auch alle sonst üblichen Applikationsverfahren wie oral, rectal,

buccal (einschließlich sublingual), pulmonal, transdermal, iontophoretisch, vaginal und intranasal. Das Arzneimittel hat eine insulinregulierende Wirkung und fördert dabei in vorteilhafter Weise den Ausgleich des Blutzuckerspiegels. Vorteilhaft für die Anwendung des Arzneimittels ist es, wenn Blutspiegel zwischen 20 und 50 pmol/l erreicht werden. Dazu sind Infusionsraten von 0,4–1,2 pmol/kg/Min. erforderlich. Bei subcutaner bzw. buccaler Applikation sind je nach galenischer Form und angestrebter Wirkdauer Substanzmengen von 5–500 nmol erforderlich. 5

Die erfindungsgemäßen Exendin-Analoga oder pharmakologisch verträglichen Salze hiervon werden vorzugsweise als sterile Lyophilisate gelagert und vor der Applikation mit einer geeigneten isotonischen Lösung vermischt. In dieser Form können die Analoga dann injiziert, infundiert oder gegebenenfalls auch durch die Schleimhäute absorbiert werden. Als Lösungsmittel können die üblichen, für die Injektion oder Infusion geeigneten isotonischen, wäßrigen Systeme, die die bei Injektionslösungen üblichen Zusätze wie Stabilisierungsmittel und Lösungsvermittler enthalten, verwendet werden. Physiologische Kochsalzlösung oder gegebenenfalls durch Puffer isotonisch gestellte Lösungen werden in diesem Fall bevorzugt. 10

Zusätze sind z. B. Tartrat- oder Citratpuffer, Ethanol, Komplexbildner (wie Ethylendianmintetraessigsäure und deren nichttoxischen Salze), hochmolekulare Polymeren (wie flüssiges Polyethylenoxid) zur Viskositätsregulierung. Flüssige Trägerstoffe für Injektionslösungen müssen steril sein und werden vorzugsweise in Ampullen abgefüllt. Feste Trägerstoffe sind z. B. Stärke, Lactose, Mannit, Methylcellulose, Talkum, hochdisperse Kieselsäuren, höhermolekulare Fettsäuren (wie Stearinsäure), Gelantine, Agar-Agar, Calciumphosphat, Magnesiumstearat, tierische und pflanzliche Fette, feste hochmolekulare Polymere (wie Polyethylenglykol); für orale Applikation geeignete Zubereitungen können falls gewünscht Geschmacks- und Süßstoffe enthalten. Für die nasale Applikation können Surfactants zur Verbesserung der Absorption durch die nasale Schleimhaut zugesetzt werden, z. B. Cholsäure, Taurocholsäure, Chenodeoxycholsäure, Glykolsäure, Dehydrocholsäure, Deoxycholsäure und Cyclodextrine. 15 20

Die zu verabreichende Tagesdosis liegt im Bereich von 150–500 nmol. Die Bestimmung der biologischen Aktivität basiert auf Messungen gegen internationale Referenzpräparationen für Glucagon-like peptide-1, Exendin-3 oder Exendin-4 in einem gebräuchlichen Testverfahren für Glucagon-like peptide-1. 25

Die erfindungsgemäßen Exendin-Analoga können nach den in der Peptidsynthese üblichen Verfahren hergestellt werden, wie sie z. B. in J. M. Steward und J. D. Young "Solid Phase Peptide Synthesis", 2nd ed, Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois (1984) und J. Meienhofer "Hormonal Proteins and Peptides", Vol. 2, Academic Press, New York, (1973) für die Festphasensynthese und in E. Schroder und K. Lubke "The Peptides", Vol. 1, Academic Press, New York, (1965) für die Flüssigphasensynthese beschrieben worden sind. 30

Allgemeine Verfahren zur Peptidsynthese

Im allgemeinen werden bei der Synthese von Peptiden geschützte Aminosäuren zu einer wachsenden Peptidkette addiert. Die erste Aminosäure ist entweder an der Aminogruppe oder der Carboxylgruppe sowie an jeglicher reaktiver Gruppe in der Seitenkette geschützt. Diese geschützte Aminosäure wird entweder an einen inerten Träger gekoppelt oder kann auch in Lösung eingesetzt werden. Die nächste Aminosäure in der Peptidsequenz wird passend geschützt unter Bedingungen, welche die Ausbildung einer Amidbindung begünstigen, zu der ersten gegeben. Nachdem alle gewünschten Aminosäuren in der richtigen sequentiellen Abfolge gekuppelt wurden, werden die Schutzgruppen und gegebenenfalls die Trägerphase abgespalten. Das erhaltene rohe Polypeptid wird umgefällt und vorzugsweise chromatographisch zum Endprodukt gereinigt. 35 40

Eine bevorzugte Methode zur Darstellung von Analoga physiologisch aktiver Polypeptide, mit weniger als etwa vierzig Aminosäuren, beinhaltet die Festphasenpeptidsynthese. Bei dieser Methode werden die α -Aminofunktionen (N^{α}) und jegliche reaktive Seitenketten mit säure- oder basenlabilen Gruppen geschützt. Die verwendeten Schutzgruppen sollten unter den Bedingungen der Knüpfung von Amidbindungen stabil sein, aber sich leicht abspalten lassen ohne die entstandene Polypeptidkette zu beeinträchtigen. Zu den geeigneten Schutzgruppen für die α -Aminofunktion gehören die folgenden Gruppen, sind aber nicht auf diese limitiert: t-Butyloxycarbonyl (Boc), Benzyloxycarbonyl (Z), o-Chlorbenzyloxycarbonyl, Biphenylisopropylloxycarbonyl, tert-Amyloxycarbonyl (Amoc), α,α -Dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl, o-Nitrosulfonyl, 2-Cyano-t-butoxycarbonyl, 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc), 1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)ethyl (Dde) und ähnliche. Vorzugsweise wird 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) als N^{α} -Schutzgruppen eingesetzt. 45 50

Zu den geeigneten Seitenkettenschutzgruppen gehören die folgenden, sind aber nicht auf diese limitiert: Acetyl, Allyl (All), Allyloxycarbonyl (Alloc), Benzyl (Bzl), Benzyloxycarbonyl (Z), t-Butyloxycarbonyl (Boc), Benzyloxymethyl (Bom), o-Brombenzyloxycarbonyl, t-Butyl (tBu), t-Butyldimethylsilyl, 2-Chlorbenzyl, 2-Chlorbenzyloxycarbonyl (2-ClZ), 2,6-Dichlorbenzyl, Cyclohexyl, Cyclopentyl, 1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)ethyl (Dde), Isopropyl, 4-Methoxy-2,3,6-trimethylbenzyl-sulfonyl (Mtr), 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl (Pmc), Pivalyl, Tetrahydropyran-2-yl, Tosyl (Tos), 2,4,6-Trimethoxybenzyl, Trimethylsilyl und Trityl (Trt). 55

Bei der Festphasensynthese wird die C-terminale Aminosäure als erste an ein geeignetes Trägermaterial gekuppelt. Geeignete Trägermaterialien sind solche, die inert gegen die Reagenzien und die Reaktionsbedingungen der schrittweisen Kondensations- und Abspaltungsreaktionen sind, und welche sich nicht in den benutzten Reaktionsmedien lösen. Beispiele für kommerziell erhältliche Trägermaterialien beinhalten Styrol/Divinylbenzol Copolymerisate, welche mit reaktiven Gruppen und/oder Polyethylenglykol modifiziert wurden, so auch chlormethyliertes Styrol/Divinylbenzol Copolymer, hydroxy- oder aminomethyliertes Styrol/Divinylbenzol Copolymer und ähnliche. Mit 4-Benzyloxybenzylalkohol (Wang-Anker (Wang, S. S. 1973)) oder 2-Chlortritylchlorid (Barlos, K. et. al. 1989) derivatisiertes Polystyrol(1%)divinylbenzol oder TentaGel® (Rapp Polymere, Tübingen) wird bevorzugt eingesetzt, falls die Peptidsäure dargestellt werden soll. Handelt es sich um das Peptidamid, so wird das mit 5-(4'-aminomethyl)-3',5'-dimethoxy-phenoxy)valeriansäure (PAL-Anker) (Albericio, F. et. al. 1987) 60 65

oder der p-(2,4-Dimethoxyphenyl-aminomethyl)-phenoxy-Gruppe (Rink-Amid-Anker (Rink, H. 1987)) derivatisiertes Polystyrol(1%)divinylbenzol oder TentaGel® bevorzugt.

Die Anknüpfung an die polymeren Träger kann durch Reaktion der C-terminalen Fmocgeschützten Aminosäure, unter Zusatz eines Aktivierungsreagenzes, in Ethanol, Acetonitril, N,N-Dimethylformamid (DMF), Dichlormethan, Tetrahydrofuran, N-Methylpyrrolidon oder ähnlichen Solventien, vorzugsweise in DMF, mit dem Trägermaterial bei Raumtemperatur oder erhöhten Temperaturen, z. B. zwischen 40°C und 60°C, vorzugsweise bei Raumtemperatur, und Reaktionszeiten von 2 bis 72 Stunden, vorzugsweise etwa 2 x 2 Stunden, erreicht werden.

Die Kupplung der N^α-geschützten Aminosäure, vorzugsweise der Fmoc-Aminosäure, an das PAL-, Wang- oder Rink-Anker kann beispielsweise mit Hilfe von Kupplungsreagenzien wie N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC) oder anderen Carbodiimiden, 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborat (TBTU) oder anderen Uronium-Salzen, O-Acyl-Harnstoffen, Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphat (PyBOP) oder anderen Phosphonium-Salzen, N-hydroxysuccinimiden, anderen N-Hydroxyimiden, oder Oximen, in Gegenwart oder auch in Abwesenheit von 1-Hydroxybenzotriazol oder 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol, vorzugsweise mit Hilfe von TBTU unter Zusatz von HOBt, mit oder ohne Zusatz einer Base wie beispielsweise Diisopropylethylamin (DIEA), Triethylamin oder N-Methylmorpholin, vorzugsweise Diisopropylethylamin, bei Reaktionszeiten von 2 bis 72 Stunden, vorzugsweise 3 Stunden, in einem 1,5 bis 3-fachem Überschuß der Aminosäure und der Kupplungsreagenzien, vorzugsweise in einem 2-fachen Überschuß und Temperaturen zwischen etwa 10°C und 50°C, vorzugsweise bei 25°C, in einem Lösungsmittel wie Dimethylformamid, N-Methylpyrrolidon oder Dichlormethan, vorzugsweise Dimethylformamid, durchgeführt werden. Anstelle der Kupplungsreagenzien kann auch der Aktivester (z. B. Pentafluorphenyl, p-Nitrophenyl oder ähnliche), das symmetrische Anhydrid der N^α-Fmoc-Aminosäure, deren Säurechlorid oder -fluorid unter den oben beschriebenen Bedingungen eingesetzt werden.

Die Kupplung der N^α-geschützten Aminosäure, vorzugsweise der Fmoc-Aminosäure, an das 2-Chlortrityl-Harz wird bevorzugt in Dichlormethan unter Zusatz von DIEA, bei Reaktionszeiten von 10 bis 120 Minuten, vorzugsweise 20 Minuten, durchgeführt, ist aber nicht auf die Verwendung dieses Lösungsmittels und dieser Base beschränkt.

Die sukzessive Kupplung der geschützten Aminosäuren kann nach den in der Peptidsynthese üblichen Verfahren typischerweise in einem Peptidsyntheseautomaten durchgeführt werden. Nach Abspaltung der N^α-Fmoc-Schutzgruppe der gekuppelten Aminosäure auf der Festphase durch Behandlung mit Piperidin (10% bis 50%) in Dimethylformamid für 5 bis 20 Minuten, vorzugsweise 2 x 2 Minuten mit 50% Piperidin in DMF und 1 x 15 Minuten mit 20% Piperidin in DMF, wird die nächste geschützte Aminosäure in einem 3 bis 10-fachen Überschuß, vorzugsweise in einem 10-fachen Überschuß, in einem inerten, nichtwäßrigen, polaren Lösungsmittel, wie Dichlormethan, DMF oder Mischungen aus beiden, vorzugsweise DMF, und Temperaturen zwischen etwa 10°C und 50°C, vorzugsweise bei 25°C, an die vorhergehende gekoppelt. Als Kupplungsreagenzien kommen die bei der Kupplung der ersten N^α-Fmoc-Aminosäure an den PAL-, Wang- bzw. Rink-Anker bereits erwähnten Reagenzien in Frage. Wiederum können alternativ auch Aktivester der geschützten Aminosäure deren Chloride oder Fluoride oder deren symmetrische Anhydride verwendet werden.

Am Ende der Festphasensynthese wird das Peptid vom Trägermaterial abgespalten unter gleichzeitiger Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen. Die Abspaltung kann mit Trifluoressigsäure oder anderen stark sauren Medien unter Zusatz von 5%–20% v/v Scavengern wie Dimethylsulfid, Ethylmethylsulfid, Thioanisol, Thiokresol, m-Kresol, Anisol, Ethandithiol, Phenol oder Wasser, vorzugsweise 15% v/v Dimethylsulfid/ Ethandithiol/m-Kresol 1 : 1 : 1, innerhalb von 0,5 bis 3 Stunden, vorzugsweise 2 Stunden, erfolgen. In den Seitenketten vollgeschützte Peptide werden durch Spaltung des 2-Chlortritylankers mit Eis-essig/Trifluoethanol/Dichlormethan 2 : 2 : 6 erhalten. Das geschützte Peptid kann durch Chromatographie über Silicagel gereinigt werden. Ist das Peptid über den Wang-Anker mit der Festphase verbunden, und soll ein Peptid mit C-terminaler Alkylamidierung erhalten werden, so kann die Abspaltung über eine Aminolyse mit einem Alkylamin oder Fluoroalkylamin durchgeführt werden. Die Aminolyse wird bei Temperaturen zwischen etwa –10°C und 50°C, vorzugsweise etwa 25°C, und Reaktionszeiten zwischen etwa 12 und 24 Stunden, vorzugsweise etwa 18 Stunden, durchgeführt. Weiterhin kann das Peptid auch durch Umesterung, z. B. mit Methanol, vom Träger gespalten werden.

Die erhaltene saure Lösung wird mit der 3–20-fachen Menge an kaltem Ether oder n-Hexan, vorzugsweise einem 10-fachen Überschuß Diethylether versetzt, um das Peptid auszufallen und damit von den im Ether verbleibenden Scavengern und abgespaltenen Schutzgruppen abzutrennen. Eine weitere Reinigung kann durch mehrfaches Umfällen des Peptides aus Eis-essig erfolgen. Das erhaltene Precipitat wird in Wasser oder tert-Butanol oder Mischungen der beiden Lösungsmittel, vorzugsweise einer 1 : 1 Mischung von tert-Butanol/Wasser, aufgenommen und gefriergetrocknet.

Das erhaltene Peptid kann durch einzelne oder alle der folgenden chromatographischen Methoden gereinigt werden: Ionenaustausch über ein schwach basisches Harz in der Acetat Form; hydrophobe Adsorptionschromatographie an nicht derivatisierten Polystyrol/Divinylbenzol-Copolymeren (z. B. Amberlite® XAD); Adsorptionschromatographie an Silicagel; Ionenaustauschchromatographie an Carboxymethylcellulose; Verteilungschromatographie, z. B. an Sephadex® G-25; Gegenstromverteilungschromatographie; oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC), insbesondere "reversed-phase" HPLC an Octyl- oder Octadecylsilylsilica (ODS)-Phasen.

Zusammenfassend beinhaltet ein Teil der vorliegenden Erfindung Verfahren zur Darstellung von Polypeptiden, und deren pharmazeutisch verwendbaren Salzen. Diese Verfahren, welche zu physiologisch aktiven verkürzten Homologen und Analogen von Exendin-3 oder Exendin-4, mit den oben erwähnten bevorzugten Kettenlängen und Modifikationen führen, setzen sich aus Verfahren zur sequentiellen Kondensation geschützter Aminosäuren auf einem geeigneten Trägermaterial, zur Abspaltung des Trägers und der Schutzgruppen, und zur

Reinigung der erhaltenen Rohpeptide zusammen.

Die Aminosäurenanalyse wurde mit einem Aminosäurenanalysator 420A der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) durchgeführt. 50 bis 1000 pmol der zu analysierenden Probe wurden in 10 bis 40 µl Lösung auf den Probenträger aufgetragen und anschließend vollautomatisch in der Gasphase bei 160°C mit 6N Salzsäure 90 Minuten hydrolysiert, mit Phenylisothiocyanat derivatisiert und on-line über eine Microbore-HPLC analysiert. Massenspektroskopische Untersuchungen wurden an einem API III Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (SCIEX, Thornhill, Kanada) ausgerüstet mit Ionenspray Ionenquelle durchgeführt.

Die geschützten Aminosäurenderivate können z. B. von der Novabiochem. GmbH (Bad Soden) bezogen werden.

Die folgenden Beispiele stellen nur eine illustrierende Auswahl des Erfindungsgedanken dar und keine Einschränkung des Erfindungsgegenstandes.

Beispiel 1

HGEGTFTSDLSKQ-Nle-EEEAVRLFIEWLKNGR—NH₂ (SEQ ID Nr. 3)

[Nle¹⁴, Arg³⁰]-Exendin-4(1–30)-NH₂

Beispiel 1 wurde in einem 0,02 mmol Ansatz nach der Festphasenmethode auf 5-(4'-aminomethyl)-3',5'-dimethoxyphenoxyvalerianyl-alanyl-aminomethyl/polystyrol(1%)divinylbenzol (Beladung: 0,5 mmol/g) auf einem Multiplen Peptidsyntheseautomaten SyRo II der Firma MultiSynTech (Bochum) synthetisiert. Die α-Aminofunktionen der Aminosäuren waren 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) geschützt. Als Seitenkettenschutzgruppen wurden t-Butyl (tBu) für Asp, Glu, Ser und Thr, Trityl (Trt) für Asn, Gln und His, t-Butyloxycarbonyl (Boc) für Lys und Trp und 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl (Pmc) für Arg eingesetzt. Die sequentielle Kupplung der geschützten Aminosäuren erfolgte in 10-fachem Überschuß mit Doppelkupplungen von 2 mal 40 Minuten Dauer und mit N,N-Diisopropylcarbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol als Aktivierungsreagenzien. Die Abspaltung des Peptides vom polymeren Träger unter gleichzeitiger Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte in Trifluoressigsäure (85%) in Gegenwart von 15% Ethandithiol/Dimethylsulfid/m-Kresol (1 : 1 : 1 v/v/v) für 120 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Peptid mit wasserfreiem Diethylether gefällt und zur vollständigen Entfernung der Thiole noch mehrfach mit wasserfreiem Diethylether gewaschen. Gefrier-trocknung des Precipitats aus Wasser/tert.-Butanol (1 : 1) ergab 62 mg des Rohpeptides. Das Rohpeptid wurde über reversed-phase HPLC mit einem Gradienten von 37% auf 42% Acetonitril/0,9% TFA in 30 Minuten gereinigt. Das Eluat wurde eingeeengt, lyophilisiert und ergab eine Ausbeute von 29 mg eines weißen Feststoffes mit einer Reinheit von ≥ 97%.

Aminosäurenanalyse: Ala 1,08 (1); Asx 1,91(2); Glx 6,10 (6); Phe 1,78 (2); Gly 3,10 (3); His 1,00 (1); Ile 0,88 (1); Lys 2,02 (2); Leu 3,24 (3); Nle 1,10 (1); Arg 1,98 (2); Ser 2,04 (2); Thr 1,99 (2); Val 0,91(1); Trp 0,87 (1).
ESI—MS: 3488,2.

Beispiel 2

HGEGTFTSDLSKQ-Nle-EEEAVRLFIEWLKNGY—NH₂ (SEQ ID Nr. 4)

[Nle¹⁴, Tyr³⁰]-Exendin-4(1–30)-NH₂

Beispiel 2 wurde in einem 0,0076 mmol Ansatz nach der Festphasenmethode auf TentaGel® (Rapp Polymere, Tübingen) synthetisiert, welches mit dem Rink-Amid-Anker (4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-aminomethyl)-phenoxy-Gruppe) derivatisiert war (Beladung: 0,18 mmol/g) auf einem Multiplen Peptidsyntheseautomaten SyRo II der Firma MultiSynTech (Bochum) synthetisiert. Die eingesetzten geschützten Aminosäuren waren analog zu Beispiel 1. Die sequentielle Kupplung der geschützten Aminosäuren erfolgte in 8-fachem Überschuß mit Einfachkupplungen von 40 Minuten Dauer, bei 40°C und unter Rühren. Als Aktivierungsreagenzien wurden 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborat (TBTU)/1-Hydroxybenzotriazol unter Zusatz von Diisopropylethylamin verwendet. Die Abspaltung und Aufreinigung des Peptides erfolgte analog zu Beispiel 1. Es wurden 18,1 mg eines weißen Feststoffes mit einer Reinheit von ≥ 95% erhalten.

Aminosäurenanalyse: Ala 1,03 (1); Asx 1,90 (2); Glx 6,24 (6); Phe 1,94 (2); Gly 3,12 20 (3); His 1,02 (1); Ile 1,09 (1); Lys 2,01 (2); Leu 3,06 (3); Nle 1,08 (1); Arg 0,97 (1); Ser 1,98 (2); Thr 1,80 (2); Val 0,93 (1); Trp 1,01(1); Tyr 0,90 (1).
ESI—MS: 3494,8.

Beispiel 3

HSDGTFTSDLSKQ-Nle-EEEAVRLFIEWLKNGR—NH₂ (SEQ II) Nr. 5)

Nle¹⁴, Arg³⁰]-Exendin-3(1–30)-NH₂

Beispiel 3 wurde analog nach der für Beispiel 2 beschriebenen Methode synthetisiert. Es wurden 17,6 mg eines weißen Feststoffes mit einer Reinheit von ≥ 99% erhalten.

Aminosäurenanalyse: Ala 0,99 (1); Asx 2,98 (3); Glx 5,16 (5); Phe 2,08 (2); Gly 2,16 (2); His 0,95 (1); Ile 1,03 (1); Lys 2,04 (2); Leu 2,91(3); Nle 1,05 (1); Arg 1,04 (1); Ser 3,00 (3); Thr 2,05 (2); Val 1,01 (1); Trp 1,18 (1); Tyr 0,98 (1).
ESI—MS: 3504,4.

Beispiel 4

HGEGTFTSDLSKOMEVEAVRLFIEWLKNGR—NH₂ (SEQ ID Nr. 6)

[Arg³⁰]-Exendin-4-(1–30)-NH₂

Beispiel 4 wurde analog nach der für Beispiel 1 beschriebenen Methode synthetisiert. Es wurden 17,9 mg eines weißen Feststoffes mit einer Reinheit von $\geq 96\%$ erhalten.

Aminosäurenanalyse: Ala 0,96 (1); Asx 2,01 (2); Glx 6,00 (6); Phe 1,80 (2); Gly 3,21 (3); His 0,96 (1); Ile 1,07 (1); Lys 1,92 (2); Leu 2,98 (3); Met 1,06 (1); Arg 1,90 (2); Ser 1,91 (2); Thr 2,09 (2); Val 0,97 (1); Trp 0,84 (1).
ESI—MS: 3508,4.

Beispiel 5

GEGTFTSDLSKQ-Nle-EEEAVRLFIEWLKNGR—NH₂ (SEQ ID Nr. 7)

[Nle¹⁴, Arg³⁰]-Exendin-4-(2–30)-NH₂

Beispiel 5 wurde analog nach der für Beispiel 2 beschriebenen Methode synthetisiert. Es wurden 13,2 mg eines weißen Feststoffes mit einer Reinheit von $\geq 97\%$ erhalten.

Aminosäurenanalyse: Ala 1,04 (1); Asx 1,98 (2); Glx 6,08 (6); Phe 1,86 (2); Gly 2,91 (3); Ile 0,96 (1); Lys 1,84 (2); Leu 2,98 (3); Nle 1,04 (1); Arg 1,90 (2); Ser 1,94 (2); Thr 1,92 (2); Val 0,96 (1); Trp 0,85 (1).
ESI—MS: 3350,8.

Beispiel 6

HGEGTFTSDLSKQMEVEAVRAFIEWLKNGR—NH₂ (SEQ ID Nr. 8)

[Ala²¹, Arg³⁰]-Exendin-4-(1–30)-NH₂

Beispiel 6 wurde analog nach der für Beispiel 1 beschriebenen Methode synthetisiert. Es wurden 11,1 mg eines weißen Feststoffes mit einer Reinheit von $\geq 95\%$ erhalten.

Aminosäurenanalyse: Ala 2,08 (2); Asx 1,93 (2); Glx 6,07 (6); Phe 1,74 (2); Gly 2,97 (3); His 0,98 (1); Ile 0,87 (1); Lys 2,15 (2); Leu 2,02 (2); Met 0,96 (1); Arg 2,13 (2); Ser 1,87 (2); Thr 2,07 (2); Val 1,04 (1); Trp 0,87 (1).
ESI—MS: 3466,3.

Beispiel 7

HGEGTFTSDLSKQMEVEAVRLFIEWLKAGR—NH₂ (SEQ ID Nr. 9)

[Ala²⁸, Arg³⁰]-Exendin-4-(1–30)-NH₂

Beispiel 7 wurde analog nach der für Beispiel 1 beschriebenen Methode synthetisiert. Es wurden 15,0 mg eines weißen Feststoffes mit einer Reinheit von $\geq 97\%$ erhalten.

Aminosäurenanalyse: Ala 1,98 (2); Asx 0,98 (1); Glx 6,22 (6); Phe 1,92 (2); Gly 3,03 (3); His 0,99 (1); Ile 1,03 (1); Lys 2,05 (2); Leu 3,03 (3); Met 0,96 (1); Arg 1,84 (2); Ser 1,98 (2); Thr 2,09 (2); Val 1,01 (1); Trp 0,72 (1).
ESI—MS: 3465,4.

Beispiel 8

HGEGTFTSDLSKQMEVEAVRAFIEWLKAGR—NH₂ (SEQ ID Nr. 10)

[Ala^{21,28}, Arg³⁰]-Exendin-4-(1–30)-NH₂

Beispiel 8 wurde analog nach der für Beispiel 1 beschriebenen Methode synthetisiert. Es wurden 18,4 mg eines weißen Feststoffes mit einer Reinheit von $> 95\%$ erhalten.

Aminosäurenanalyse: Ala 3,12 (3); Asx 0,99 (1); Glx 6,04 (6); Phe 1,80 (2); Gly 3,00 (3); His 0,96 (1); Ile 1,02 (1); Lys 1,84 (2); Leu 1,97 (2); Met 0,98 (1); Arg 2,03 (2); Ser 1,91 (2); Thr 1,88 (2); Val 0,99 (1); Trp 0,99 (1).
ESI—MS: 3423,3.

Beispiel 9

In analoger Weise wurden die folgenden Exendinderivate in hoher Reinheit hergestellt. (Ex-4 = Exendin-4, Ex-3 = Exendin-3)

Exendin-Derivat	Seq.	Sequenz	
[A ¹⁴ ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-OH	11	HGEGTFTSDLSKQAE ¹¹ AVRLFIEWLKN R-OH	5
Ac-[Ile ¹⁴ ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	12	Ac- HGEGTFTSDLSKQIle ¹² EEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂	10
[Nle ¹⁴]-Ex-4-(1-27)-NH ₂	13	HGEGTFTSDLSKQNle ¹³ EEEAVRLFIEWLK- NH ₂	
[A ^{14,29} ,R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	14	HSDGTFTSDLSKQAE ¹⁴ AVRLFIEWLKNA R-NH ₂	15
[A ^{14,27} ,R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	15	HSDGTFTSDLSKQAE ¹⁵ AVRLFIEWLANG R-NH ₂	20
[A ^{14,26} ,R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	16	HSDGTFTSDLSKQAE ¹⁶ AVRLFIEWAKNG R-NH ₂	
[A ² , Nle ¹⁴ ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	17	HAEGTFTSDLSKQNle ¹⁷ EEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂	25
[C ² , Nle ¹⁴ ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	18	HCEGTFTSDLSKQNle ¹⁸ EEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂	30
[D ² , Nle ¹⁴ ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	19	HDEGTFTSDLSKQNle ¹⁹ EEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂	35
[E ² , Nle ¹⁴ ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	20	HEEGTFTSDLSKQNle ²⁰ EEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂	
[F ² , Nle ¹⁴ ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	21	HFEGTFTSDLSKQNle ²¹ EEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂	40
[H ² Nle ¹⁴ ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	22	HHEGTFTSDLSKQNle ²² EEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂	45
[I ² , Nle ¹⁴ ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	23	HIEGTFTSDLSKQNle ²³ EEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂	50
			55
			60
			65

	[K ² , Nle ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	24	HKEGTFTSDLSKQNIeEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂
5	[L ² , Ie ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	25	HLEGTFTSDLSKQNIeEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂
10	[M ² , Nle ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	26	HMEGTFTSDLSKQNIeEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂
	[N ² , Nle ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	27	HNEGTFTSDLSKQNIeEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂
15	[P ² , Nle ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	28	HPEGTFTSDLSKQNIeEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂
20	[Q ² , Nle ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	29	HQEGTFTSDLSKQNIeEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂
	[R ² , Nle ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	30	HREGTFTSDLSKQNIeEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂
25	[S ² , Nle ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	31	HSEGTFTSDLSKQNIeEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂
30	[T ² , Nle ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	32	HTEGTFTSDLSKQNIeEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂
35	[V ² , Nle ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	33	HVEGTFTSDLSKQNIeEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂
	[W ² , Nle ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	34	HWEGTFTSDLSKQNIeEEEEAVRLFIEWLK NGR-NH ₂
40	[Y ² , Nle ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	35	HYEGTFTSDLSKQNIeEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂
45	[A ^{2,24} , G ¹⁶ , E ²¹ , K ^{20,28} , Q ¹⁷ , R ³⁰ , S ¹² , V ²⁷ , Y ¹³]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	36	HADGTFTSDLSSYMEGQAVKEFIAWLK GR-NH ₂
	[A ^{14,25} , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	37	HSDGTFTSDLSKQAEAAAARLFIKNG R-NH ₂
50	[E ³ , A ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	38	HSEGTFTSDLSKQAEAAAARLFIKNG R-NH ₂
55	[A ¹ , V ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	39	ASDGTFTSDLSKQVEAAAARLFIKNG R-NH ₂

[A ^{3,14} ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	40	HGAGTFTSDLSKQAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	
[A ^{5,14} ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	41	HGEGAFTSDLSKQAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	5
[A ¹⁴ ,R ³⁰ ,Y ⁵]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	42	HGEGYFTSDLSKQAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	10
[A ¹⁴ ,R ³⁰ ,Y ⁶]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	43	HGEGTYTSDLSKQAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	
[A ¹⁴ ,I ⁶ ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	44	HGEGTITS ⁵ SDLSKQAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	15
[A ¹⁴ ,R ³⁰ ,S ⁷]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	45	HGEGTFSSDLSKQAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	20
[A ¹⁴ ,R ³⁰ ,Y ⁷]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	46	HGEGTFYSDLSKQAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	
[A ¹⁴ ,R ³⁰ ,T ⁸]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	47	HGEGTFTTSDLSKQAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	25
[A ¹⁴ ,R ³⁰ ,Y ⁸]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	48	HGEGTFTYDLSKQAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	30
[A ¹⁴ ,E ⁹ ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	49	HGEGTFTSELSKQAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	35
[A ^{10,14} ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	50	HGEGTFTSDASKQAE ⁵ AVRLFIEWLKNG GR-NH ₂	
[A ^{11,14} ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	51	HGEGTFTSDLAKQAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	40
[A ^{12,14} ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	52	HGEGTFTSDLSAQAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	45
[A ^{13,14} ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	53	HGEGTFTSDLSKAAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	
[A ^{14,15} ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	54	HGEGTFTSDLSKQAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	50
[A ^{14,16} ,G ¹ ,R ³⁰ ,S ⁵]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	55	GSDGSFTSDLSKQAEAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	55

60

65

	[A ^{14,17} ,K ¹ ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	56	KGEGTFTSDLSKQAEAAVRLFIEWLKNG R-NH ₂
5	[A ¹⁴ ,L ¹⁸ ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	57	HGEGTFTSDLSKQAEELVRLFIEWLKNG R-NH ₂
10	[A ¹⁴ ,I ¹⁹ ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	58	HGEGTFTSDLSKQAEAAIRLFIEWLKNG R-NH ₂
	[A ^{14,20} ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	59	HGEGTFTSDLSKQAEAAVALFIEWLKNG R-NH ₂
15	[A ¹⁴ ,R ³⁰ ,Y ²²]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	60	HSDGTFTSDLSKQAEAAVRLYIEWLKNG R-NH ₂
20	[A ¹⁴ ,R ³⁰ ,V ²³]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	61	HGEGTFTSDLSKQAEAAVRLFVEWLKN GR-NH ₂
	[A ¹⁴ ,L ²⁴ ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	62	HGEGTFTSDLSKQAEAAVRLFILWLKNG R-NH ₂
25	[A ^{14,25} ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	63	HGEGTFTSDLSKQAEAAVRLFIEALKNG R-NH ₂
30	[A ^{14,26} ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	64	HGEGTFTSDLSKQAEAAVRLFIEWAKN GR-NH ₂
	[A ^{14,27} ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	65	HGEGTFTSDLSKQAEAAVRLFIEWLANG R-NH ₂
35	[A ^{14,29} ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	66	HGEGTFTSDLSKQAEAAVRLFIEWLKNA R-NH ₂
40	[A ¹⁴ ,R ³⁰]-Ex-4-(1-30)-NH ₂	67	HGEGTFTSDLSKQAEAAVRLFIEWLKNG R-NH ₂
45	[R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	68	HSDGTFTSDLSKQMEAAVRLFIEWLKNG R-NH ₂
	[Nle ¹⁴ ,Y ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	69	HSDGTFTSDLSKQNleAAVRLFIEWLKN GY-NH ₂
50	[Nle ¹⁴ ,R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-OH	70	HSDGTFTSDLSKQNleAAVRLFIEWLKN GR-OH
55	[A ¹⁴ ,R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	71	HSDGTFTSDLSKQAEAAVRLFIEWLKNG R-NH ₂

[Nie ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(2-30)-NH ₂	72	SDGTFTSDLSKQNieEEEEAVRLFIEWLKNG R-NH ₂	
[Nie ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(3-30)-NH ₂	73	DGTFTSDLSKQNieEEEEAVRLFIEWLKNG R-NH ₂	5
Ac-[Nie ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(2-30)-NH ₂	74	Ac- SDGTFTSDLSKQNieEEEEAVRLFIEWLKNG R-NH ₂	10
Ac-[Nie ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(3-30)-NH ₂	75	Ac- DGTFTSDLSKQNieEEEEAVRLFIEWLKNG R-NH ₂	15
Suc-[Nie ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(3-30)-NH ₂	75	Suc- DGTFTSDLSKQNieEEEEAVRLFIEWLKNG R-NH ₂	20
[Nie ¹⁴]-Ex-3-(1-27)-NH ₂	76	HSDGTFTSDLSKQNieEEEEAVRLFIEWLK- NH ₂	25
[K ² , P ³ , A ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	77	HKPGTFTSDLSKQAEAAAAVRLFIEWLKNG R-NH ₂	
[A ² , Nie ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	78	HADGTFTSDLSKQNieEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂	30
[C ² , Nie ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	79	HCDGTFTSDLSKQNieEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂	35
[D ² , Nie ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	80	HDDGTFTSDLSKQNieEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂	
[E ² , Nie ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	81	HEDGTFTSDLSKQNieEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂	40
[F ² , Nie ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	82	HFDGTFTSDLSKQNieEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂	45
[G ² , Nie ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	83	HGDGTFTSDLSKQNieEEEEAVRLFIEWLK NGR-NH ₂	
[H ² , Nie ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	84	HHDGTFTSDLSKQNieEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂	50
[I ² , Nie ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	85	HIDGTFTSDLSKQNieEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂	55

60

65

	[K ² , Nle ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	86	HKDGTFTSDLSKQNIeEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂
5	[L ² , Nle ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	87	HLDGTFTSDLSKQNIeEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂
10	[M ² , Nle ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	88	HMDGTFTSDLSKQNIeEEEEAVRLFIEWLK NGR-NH ₂
	[N ² , Nle ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	89	HNDGTFTSDLSKQNIeEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂
15	[P ² , Nle ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	90	HPDGTFTSDLSKQNIeEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂
20	[Q ² , Nle ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	91	HQDGTFTSDLSKQNIeEEEEAVRLFIEWLK NGR-NH ₂
	[R ² , Nle ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	92	HRDGTFTSDLSKQNIeEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂
25	[T ² , Nle ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	93	HTDGTFTSDLSKQNIeEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂
30	[V ² , Nle ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	94	HVDGTFTSDLSKQNIeEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂
	[W ² , Nle ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	95	HWDGTFTSDLSKQNIeEEEEAVRLFIEWLK NGR-NH ₂
35	[Y ² , Nle ¹⁴ , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	96	HYDGTFTSDLSKQNIeEEEEAVRLFIEWLKN GR-NH ₂
40	[A ^{3,14} , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	97	HSAGTFTSDLSKQAE ³ EEEEAVRLFIEWLKNG R-NH ₂
	[A ^{5,14} , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	98	HSDG ⁵ AFTSDLSKQAE ³ EEEEAVRLFIEWLKNG R-NH ₂
45	[A ¹⁴ , R ³⁰ , Y ⁵]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	99	HSDGYFTSDLSKQAE ³ EEEEAVRLFIEWLKNG R-NH ₂
50	[A ¹⁴ , R ³⁰ , Y ⁶]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	100	HSDGTYTSDLSKQAE ³ EEEEAVRLFIEWLKNG R-NH ₂
55	[A ¹⁴ , I ⁶ , R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	101	HSDGTITS ⁶ SDLSKQAE ³ EEEEAVRLFIEWLKNG R-NH ₂

[A ¹⁴ ,R ³⁰ ,S ⁷]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	102	HSDGTFSSDLSKQAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	
[A ¹⁴ ,R ³⁰ ,Y ⁷]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	103	HSDGTFYS ⁵ DLSKQAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	5
[A ¹⁴ ,R ³⁰ ,T ⁸]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	104	HSDGTFTDLSKQAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	10
[A ¹⁴ ,R ³⁰ ,Y ⁸]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	105	HSDGTFTYDLSKQAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	
[A ¹⁴ ,E ⁹ ,R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	106	HSDGTFTSELSKQAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	15
[A ^{10,14} ,R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	107	HSDGTFTSDASKQAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	20
[A ^{11,14} ,R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	108	HSDGTFTSDLAKQAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	
[A ^{12,14} ,R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	109	HGEGTFTSDLSAQAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	25
[A ^{13,14} ,R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	110	HSDGTFTSDLSKAAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	30
[A ^{14,15} ,R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	111	HSDGTFTSDLSKQAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	35
[A ^{14,17} ,K ¹ ,R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	112	KSDGTFTSDLSKQAE ⁵ AVRLFIEWLKNG R-NH ₂	
[A ¹⁴ ,L ¹⁸ ,R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	113	HSDGTFTSDLSKQAE ⁵ ELVRLFIEWLKNG R-NH ₂	40
[A ¹⁴ ,I ¹⁹ ,R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	114	HSDGTFTSDLSKQAE ⁵ AIRLFIEWLKNG R-NH ₂	45
[A ^{14,20} ,R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	115	HSDGTFTSDLSKQAE ⁵ AVLFIEWLKNG R-NH ₂	
[A ¹⁴ ,R ³⁰ ,Y ²²]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	116	HSDGTFTSDLSKQAE ⁵ AVRLYIEWLKNG R-NH ₂	50
[A ¹⁴ ,R ³⁰ ,V ²³]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	117	HSDGTFTSDLSKQAE ⁵ AVRLFVEWLKN GR-NH ₂	55
[A ¹⁴ ,L ²⁴ ,R ³⁰]-Ex-3-(1-30)-NH ₂	118	HSDGTFTSDLSKQAE ⁵ AVRLFILWLKNG R-NH ₂	60

Biologische Daten

Peptidmetabolismus in Ektopeptidase-Preparationen oder an Nieren-Microvilli Membranpräparationen

Präparation von Bürstensaum Microvillimembranen

Mittels subzellulärer Fraktionierung unter Verwendung der Differentialzentrifugationsmethode (Booth and

Kenny (1975)) werden Microvillimembranen des Ratten- und Schweinenierencortex isoliert. Zur Beurteilung des Reinheitsgrades und der Ausbeute der Membranen werden 4 Bürstensaum-Ektopeptidasen fluorimetrisch und andere Markerenzyme kolorimetrisch gemessen.

Ektopeptidase Präparationen

Gereinigte humane Neutrale Endopeptidase 24.11 wurde in der rekombinanten Form von Genentech (San Francisco, USA), Dipeptidyl Peptidase IV wurde als Isolat aus humaner Placenta von Calbiochem (Bad Soden) bezogen.

Inkubations-Protokoll

Microvilli Membranen (0,5–1 µg Protein) oder die jeweilige Ektopeptidase Präparation (60–300 ng) wurden mit 10 µg Peptid (etwa 3 nmol) in 100 µl HEPES Puffer (50 mM, pH 7,4), welcher 50 mM NaCl enthielt, inkubiert. An vorher bestimmten Zeitpunkten (Dauer bis zu 1 Stunde) wurden die Reaktionen durch Kochen abgebrochen. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (10 000 × g), mit 150 µl 0,1% TFA verdünnt und mittels "reversed phase" (RP) HPLC analysiert. Jede Probe wurde doppelt bestimmt.

HPLC Analyse

Für die HPLC Analyse wurde ein System mit den folgenden Komponenten verwendet: Eine "2248" Niederdruckpumpe (Pharmacia-LKB, Freiburg), ein WISP 10B Autoinjector (Millipore-Waters, Eschborn), ein UV-Detektor SP-4 (Gynkotec, Berlin), ein Niederdruck-Mischsystem (Pharmacia-LKB, Freiburg) und einer "Program Manager" Software-Steuerung (Pharmacia-LKB, Freiburg). Die Trennungen erfolgten über Lichrospher C-8, 5 µ, 4 × 124 mm (Merck, Darmstadt) mit einem binären Gradienten mit den Laufmitteln A: 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) und B: Acetonitril:Wasser:TFA (70 : 29,9 : 0,1). Nach der Injektion von 244 µl der Probenlösung auf die mit Laufmittel A equilibrierte Säule, wurden die Inkubationsprodukte mit einem linearen Gradienten von 0% auf 80% B in 80 min eluiert und bei 215 nm UV-Absorption detektiert.

Berechnung der Proteolyse-Raten

Für jede Inkubationszeit eines jeden Peptides wurden zwei Messungen durchgeführt und die mittlere Peak-Höhe des Substrat-Peaks gegen die Zeit aufgetragen. Am Beispiel von GLP-1 konnte gezeigt werden, daß die Peakhöhe linear proportional zur Quantität des Peptides in der Probenlösung ist. Innerhalb der ersten Stunde der Inkubation mit den Microvilli-Membranen oder den Peptidasen konnte außerdem eine lineare Abnahme der Peakhöhe mit der Zeit beobachtet werden. Die Proteolyse-Rate wird also durch die Abnahme der Höhe des Substratpeaks bestimmt und in [µmol Substrat/mg Protein/Minute] angegeben.

Abbaustabilität von Exendin-Analoga

[Nle¹⁴, Arg³⁰]-Exendin-4-(1–30)-NH₂ (Seq. ID Nr. 3) wurde mit der Neutralen Endopeptidase 24.11 wie oben beschrieben inkubiert und die Abbaurrate wurde bestimmt. Als Kontrolle diente GLP1-(7–36)-NH₂. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1

	Abbaurrate [mM/100 ng/ml NEP24.11/min]
GLP1-(7–36)-NH ₂	0,0586
[Nle ¹⁴ , Arg ³⁰]-Ex-4-1–30)-NH ₂ Bsp. 1	0,0083

Messung der Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration in B-Zellen des endokrinen Pankreas (klonale B-Zelllinie INS-1)

Zucht von INS–1-Zellen (Asfari, M., 1992)

INS–1-Zellen werden in RPMI 1640 Medium mit 10% FKS, 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,4), 2 mM L-Glutamin, 100 i.U. Penicillin/ml, 100 µg Streptomycin/ml, 1 mM Pyruvat (Natriumsalz) und 50 µM 2-Mercaptoethanol kultiviert, bei 37°C, in einer Atmosphäre von 95% Luft und 5% CO₂. Nach 6 bis 8 Tagen Wachstum auf Kunststoff-Zellkulturplatten werden die subkonfluenten Zellen nach einmaligem Spülen mit PBS (phosphate-buffered saline) durch vierminütige Inkubation bei 37°C mit 0,025% Trypsin und 0,27 mM EDTA in isosmotischer Salzlösung von der Unterlage abgelöst.

Präparation der Zellen für Calciummessungen

Die abgelösten Zellen werden in Spinnermedium (Kulturmedium wie oben, jedoch mit 5% FKS sowie 25 mM

HEPES) resuspendiert und bei 37°C zweieinhalb Stunden in einer Spinnerflasche mit Rührstab inkubiert. Danach Entfernung des Mediums durch Zentrifugation und Resuspension der Zellen in Spinnermedium. Dann für 30 Minuten Inkubation bei 37°C mit 2 µM Fura-2/Acetoxymethylester, unter denselben Bedingungen wie zuvor. Die Fura-Beladung der Zellen wird durch einmaliges Waschen der Zellen in Spinnermedium (Raumtemperatur) beendet. Danach werden die Zellen in Spinnermedium mit Raumtemperatur resuspendiert (2×10^7 Zellen/ml). Aus dieser Suspension werden die Zellen für Calciummessungen entnommen. 5

Messungen der cytosolischen Calciumkonzentration

Die Messungen erfolgen bei 37°C in einem modifizierten Krebs-Ringer Puffer (KRBH) mit 136 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 1,2 mM KH₂PO₄, 5 mM NaHCO₃, 10 mM Glukose, 250 µM Sulfinpyrazon (zur Hemmung von Fura-2 Efflux in das Medium) und 25 mM HEPES-Puffer (mit NaOH auf pH 7,4). Die Zellkonzentration beträgt $1-2 \times 10^6$ /ml. Die Messungen werden in einer mittels Rührstab gerührten Küvette in einem Spektralfluorimeter bei 37°C durchgeführt, mit 1,5 ml Zellsuspension. Exzitationswellenlänge ist 340 nm, Emissionswellenlänge 505 nm. Am Ende der Messungen werden 50 µM MnCl₂ und darauf 100 µM DTPA (Diethylentriaminpentaacetat) zugegeben, um durch eine vorübergehende Löschung ("Quenching") der Fluoreszenz von extrazellulärem Fura den Anteil des extrazellulären Fluoreszenzindikators an der gemessenen Fluoreszenz bestimmen zu können. Nach der Zugabe von DTPA folgt die Überführung des gesamten Furas zunächst in einen calciumgesättigten und dann in einen calciumfreien Zustand, zur Ermittlung der Eichwerte F_{\max} (calciumgesättigt) und F_{\min} (calciumfrei) für die jeweilige Messung. Dazu werden die Zellen durch Zugabe von 0.1% Triton X-100 lysiert. Durch den Kontakt mit der hohen extrazellulären Calciumkonzentration wird der Farbstoff mit Calcium gesättigt. Danach werden 5 mM EGTA (Ethylenbis(oxyethylenitrilo)tetraacetat) und 20 mM Tris-Lösung zugegeben, um den Farbstoff vollständig in die calciumfreie Form zu überführen. 10 15 20

Die Berechnung der cytosolischen Calciumionenkonzentration erfolgt nach dem von R. Tsien und Mitarbeitern eingeführten Algorhythmus (Grynkiewicz, G., 1985): 25

$$[Ca^{2+}]_{\text{cyt}} = ((F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)) \times K_D$$

(F: Fluoreszenz des jeweiligen Meßpunkts;

K_D : Dissoziationskonstante des Calciumkomplexes des Fura-2, 225 nM (Grynkiewicz, G., 1985)). 30

(Vor dieser Berechnung wird eine Kompensation für die Anwesenheit von extrazellulärem Fura durchgeführt. Dazu wird zunächst der durch Manganzugabe ermittelte Fluoreszenzbetrag (extrazelluläres Fura) von den Fluoreszenzwerten der Meßpunkte subtrahiert. Dann wird F_{\max} durch die Subtraktion desselben Betrags korrigiert. Schließlich wurde der Korrekturbetrag für F_{\min} ermittelt. Dazu wird der durch Manganzugabe bestimmte Fluoreszenzbetrag durch den Wert 2,24 dividiert. Der Wert 2,24 war als geräteeigener Proportionalitätsfaktor zwischen der Fluoreszenz von calciumgesättigtem und calciumfreiem Fura-2 bei einer Exzitationswellenlänge von 340 nm bestimmt worden (gemessen mit unverestertem, freiem Fura-2). Der so erhaltene Korrekturbetrag wurde von F_{\min} subtrahiert). 35

Die untersuchten Peptide wurden aus tausendfach konzentrierten Lösungen (10^{-5} M) in KRBH ohne CaCl₂ und Glukose zugegeben. 40

Aktivität der Exendin-Analoga

Einige Exendin-Analoga wurden im oben beschriebenen Calcium-Assay an INS-1 Zellen auf ihre biologische Aktivität getestet. Die Daten sind beispielhaft in Abbildung 1 als auch in Tabelle 2 gezeigt. 45

Tabelle 2

SEQ. ID Nr.	Konzentration der Peptide 10^{-8} M	$\Delta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ $\pm \text{SD (n = 4)}$
6	[Arg ³⁰]-Exendin-(1-30)-NH ₂	64 \pm 8 nM
3	[Nle ¹⁴ , Arg ³⁰]-Exendin-(1-30)- NH ₂	63 \pm 8 nM
8	[Ala ²¹ , Arg ³⁰]-Exendin-(1-30)- NH ₂	61 \pm 11 nM
9	[Ala ²⁸ , Arg ³⁰]-Exendin-(1-30)- NH ₂	65 \pm 15 nM
10	[Ala ^{21,28} , Arg ³⁰]-Exendin-(1-30)- NH ₂	69 \pm 30 nM
Kontrolle:		
GLP-1-(7-36)amide		65 \pm 10 nM

Literatur

- Albericio, F. and Barany, G. (1987) *Int. J. Peptide Protein Res.* 30, 206–216.
- Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P. A. and Wollheim, C. B. (1992) *Endocrinology* 130, 167–178.
- Barlos, K., Gatos, D., Kapolos, S., Paphotiu, G., Schafer, W., and Wengqing, Y. (1989) *Tetrahedron Lett.* 30, 3947–3950.
- Booth, and Kenny, (1975) *Biochem. J.* 142, 575–581.
- Eng, J., Andrews, P. C., Kleinman, W. A., Singh, L., and Raufman, J.-P. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 20 259–20 262.
- Eng, J., Andrews, P. C., Kleinman, W. A., Singh, L., Singh, G., and Raufman, J.-P. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 7402–7405.
- Fehmann, H.C., Göke, R., Göke, B., Bachle, R., Wagner, B. and Arnold, R. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1091, 356–63.
- Göke, R., Wagner, B., Fehmann, H. C. and Göke, B. (1993a) *Res. Exp. Med. Berl.* 193, 97–103
- Göke, R., Fehman, H. C., Linn, T., Schmidt, H., Eng, J. and Göke, B. (1993b) *J. Biol. Chem.* 268, 19 650–19 655.
- Gryniewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 3440–3450.
- Gutniak, M., Orskov, C., Holst, J. J., Ahren, B. and Efendic, S. (1992) *N. Engl. J. Med.* 326, 1316–1322.
- Komatsu, R., Matsuyama, T., Namba, M., Watanabe, N., Itoh, H., Kono, N. and Tarui, S. (1989) *Diabetes* 38, 902–905.
- Kreymann, B., Williams, G., Ghatei, M. A. and Bloom, S. R. (1987) *Lancet* 2 (8571), 1300–1304.
- Nathan, D.M., Schreiber, E., Fogel, H., Mojsos, S. and Habener, J. F. (1992) *Diabetes Care* 15, 270–276.
- Nauck, M. A., Kleine, N., Orskov, C., Holst, J. J., Willms, B. and Creutzfeld, W. (1993a) *Diabetologia* 36, 741–744.
- Nauck, M. A., Heimesaat, M. M., Orskov, C., Holst, J. J., Ebert, R. and Creutzfeld, W. (1993b) *J. Clin. Invest.* 91, 301–307.
- Raufman, J. P., Singh, L., Singh, G. and Eng, J. . (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 21 432–21437.
- Rink, H. (1987) *Tetrahedron Lett.* 28, 3787–3790.
- Thorens, B., Porret, A., Buehler, L., Deng, S.P., Morel, P. and Widman, C. (1993) *Diabetes* 42, 1678–1682.
- Wang, S. S. (1973) *J. Am. Chem. Soc.* 95, 1328–1333.

Patentansprüche

1. Peptid, dadurch gekennzeichnet, daß es die Sequenz 1 oder 2 aufweist

SEQ ID NO: 1

1	5	10	15	5															
H	S	D	G	T	F	T	S	D	L	S	K	Q	M	E	E	E	A	V	
20	25	30																	
R	L	F	I	E	W	L	K	N	G	X									
																			10

SEQ ID NO: 2

1	5	10	15	15																
H	G	E	G	T	F	T	S	D	L	S	K	Q	M	E	E	E	A	V		
20	25	30																		
R	L	F	I	E	W	L	K	N	G	X										20

wobei X eine proteogene oder nichtproteogene Aminosäure außer Glycin bedeutet, die Aminosäuren in Position 1, 2, 28, 29 oder 30 unabhängig voneinander einzeln oder zusammen Teil der Sequenz sein können und der N-Terminus durch NR₁R₂ dargestellt wird, wobei

R₁ Wasserstoff, Acetyl, Trifluoracetyl, Adamantyl, Fmoc, Z, Boc, Alloc, C₁—C₆-Alkyl, C₂—C₈ Alkenyl oder C₇—C₉ Aralkyl,

R₂ Wasserstoff, Acetyl, Trifluoracetyl, Adamantyl, Fmoc, Z, Boc, Alloc, C₄—C₆-Alkyl, C₂—C₈ Alkenyl oder C₇—C₉ Aralkyl, bedeuten und der C-Terminus durch COR₃ dargestellt wird, wobei

R₃ gleich OR₄ oder NR₄R₅

mit R₄ gleich Wasserstoff oder C₁—C₆-Alkyl

mit R₅ gleich Wasserstoff oder C₁—C₆-Alkyl

bedeutet, sowie deren physiologisch verträglichen Salze und Ester.

2. Peptide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine aber höchstens 11 der folgenden Modifikationen an der Aminosäurekette erfolgt sind

(a) Die α-Aminosäure in Position 1 ist D—His, Ala, D—Ala, Gly, Lys oder D—Lys, wobei Ala, Gly oder Lys besonders bevorzugt werden; oder

(b) Die α-Aminosäure in Position 2 ist Ser, D—Ser, Thr, D—Thr, Gly, Ala, D—Ala, Ile, D—Ile, Val, D—Val, Leu oder D—Leu, bevorzugt Ser, Thr, Gly, Ala, Val, Ile oder Leu; oder

(c) Die α-Aminosäure in Position 3 ist Glu, D—Glu, Asp, D—Asp, Ala oder D—Ala, bevorzugt Glu, Asp oder Ala; oder

(d) Die α-Aminosäure in Position 4 ist Ala, D—Ala oder β-Ala, bevorzugt Ala; oder

(e) Die α-Aminosäure in Position 5 ist Ser, Tyr oder Ala; oder

(f) Die α-Aminosäure in Position 6 ist Ala, Ile, Val, Leu, Cha oder Tyr, bevorzugt Ala, Ile, Val, Leu oder Tyr; oder

(g) Die α-Aminosäure in Position 7 ist Ala, D—Ala, Tyr, D—Tyr, Ser, D—Ser oder D—Thr, bevorzugt Ala, Tyr oder Ser; oder

(h) Die α-Aminosäure in Position 8 ist Ala, Tyr oder Thr; oder

(i) Die α-Aminosäure in Position 9 ist Ala, D-Ala, Glu, D-Glu oder D-Asp, bevorzugt Ala oder Glu; oder

(j) Die Aminosäuren in Position 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 28, 29, sind unabhängig voneinander eine proteogene oder nicht-proteogene D- oder L-Aminosäure, bevorzugt eine proteino- gene L-Aminosäure; oder

(k) Die α-Aminosäure in Position 13 ist eine neutrale L-Aminosäure, bevorzugt eine neutrale proteino- gene L-Aminosäure; oder

(l) Die α-Aminosäure in Position 14 wird ersetzt durch eine neutrale L- oder D-Aminosäure außer L-Leucin, bevorzugt durch Nle, D-Nle, Ala, D—Ala, Ile, D—Ile, Val oder D—Val, besonders bevorzugt sind Ile, Val oder Ala; oder

(m) Die α-Aminosäure in Position 22 ist D—Phe, Tyr, D—Tyr, Leu, D—Leu, Val, D—Val, L—Cha, D—Cha, β-1-Nal, β-2-Nal oder β-1-D-Nal, bevorzugt sind Tyr, Leu oder Val; oder

(n) Die α-Aminosäure in Position 23 ist Leu, D—Leu, D—Ile, Val, D—Val, L—Cha, D—Cha, Tyr, D—Tyr, Phe oder D—Phe, bevorzugt sind Leu, Val, Tyr oder Phe; oder

(o) Die α-Aminosäure in Position 25, 26 oder 27 ist eine neutrale L- oder D-Aminosäure, bevorzugt eine neutrale, proteino- gene L-Aminosäure; oder

(p) Die α-Aminosäure in Position 30 ist eine proteino- gene oder nicht-proteino- gene D- oder L-Amino- säure außer Glycin, bevorzugt Arg, D—Arg, Tyr oder D—Tyr, besonders bevorzugt sind Arg oder Tyr.

3. Peptid nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es die Insulinfreisetzung stimuliert.

4. Arzneimittel enthaltend neben üblichen Trägern und Hilfsstoffen mindestens ein Peptid nach Anspruch 1,

2 oder 3.

5. Verwendung von Peptiden nach Anspruch 1, 2 oder 3 zur Herstellung von pharmazeutischen Zusammensetzungen zur Behandlung von Diabetes.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65